Bull. Soc. zool. Fr., 1998, 123(1) : 43-51.

Écophysiologie

INFLUENCE DE MÉTAUX LOURDS (CADMIUM ET PLOMB) SUR LA PRODUCTION DE VITELLOGÉNINE CHEZ LE CHILOPODE *LITHOBIUS FORFICATUS* (LINNÉ)

par

P. SCAPS, M. BRITEL, M.C. FABRE,

S. GÉRARD & M. DESCAMPS

La vitellogénine d'individus matures de *Lithobius forficatus* a été identifiée dans l'hémolymphe et caractérisée partiellement par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Dans la fraction soluble, deux bandes protéiques majeures de poids moléculaires apparents 360 et 450 kDa colorables par le noir Soudan B et le PAS ont été identifiées comme étant des lipoglycoprotéines et définies comme des vitellogénines. Les mêmes bandes protéiques sont présentes à la fois dans l'hémolymphe des femelles et, à un niveau moindre, chez les mâles. La variation de production de vitellogénine chez des individus provenant de sites contaminés ou non peut être interprétée comme une réponse microclimatique plutôt qu'un effet direct des métaux lourds sur la vitellogenèse. À l'opposé, lorsque l'on injecte du cadmium ou du plomb dans les animaux, on observe, dans un premier temps, une diminution significative puis une augmentation du taux de vitellogénine hymolymphatique chez les individus injectés, indiquant un effet de compensation. En conséquence, l'étude de l'évolution du taux de vitellogénine circulante chez des animaux provenant de populations de Chilopodes prélevés dans la nature ne peut pas être envisagée en tant que biomarqueur de pollution par les métaux lourds.

Influence of heavy metals (cadmium and lead) on vitellogenin production in the centipede *Lithobius forficatus* (Linné).

Vitellogenin was identified in the hemolymph of mature *Lithobius forficatus* and partially characterized by polyacrylamide gel electrophoresis. Two major protein bands with apparent molecular weight of about 360 and 450 kDa stained with Sudan Black B and PAS reagent were identified as lipoglycoproteins and defined as vitellogenins. The same protein bands were present in the hemolymph of females, and, to far lower levels, in males. Variation in vitellogenin production from contaminated and uncontaminated areas may be

interpreted rather as a microclimatic response than a direct effect of heavy metals on vitellogenesis. In contrast, when cadmium or lead was injected in animals, a significant decrease in vitellogenin levels was observed, compared to unpolluted controls, providing evidence for a physiological process of compensation. As a consequence, the production of vitellogenin in natural populations of centipedes may not be useful as a biomarker for these chemicals.

Introduction

Les sources de pollution métallique dans l'environnement sont le résultat de phénomènes naturels (volcanisme, érosion) ou d'introductions industrielles. La pollution métallique peut perturber l'écosystème terrestre en affectant la structure des populations d'invertébrés du sol. La protection des communautés d'invertébrés du sol nécessite des connaissances approfondies sur l'écophysiologie des métaux chez les invertébrés et leur sensibilité à l'intoxication métallique (DALLINGER & RAINBOW, 1993 ; SPURGEON *et al.*, 1994).

Les Myriapodes Chilopodes sont des animaux carnivores situés en fin de chaîne alimentaire dans l'écosystème du sol. À l'heure actuelle, les travaux portant sur les effets des métaux lourds sur la physiologie des Chilopodes concernent uniquement la structure des populations de communautés de Myriapodes forestiers prélevés en zone contaminée ou non, ainsi que l'assimilation de métaux lourds par *L. variegatus* (HOPKIN & MARTIN, 1984 ; HOPKIN *et al.*, 1985 ; READ & MARTIN, 1990 ; VAN STRAALEN & VAN WENSEN, 1986). Récemment DESCAMPS *et al.* (1996), ont étudié l'assimilation et la détoxication du cadmium et du plomb chez *L. forficatus*.

Cet article constitue une fraction d'une étude plus importante visant à estimer les effets de retombées de métaux lourds sur la physiologie d'invertébrés du sol vivant à proximité de fonderies. De plus, les données d'ordre moléculaire concernant la vitellogénine et le cycle ovogénétique chez les Chilopodes sont très rares (FABRE *et al.*, 1992). En conséquence, les buts de cette étude étaient en premier lieu d'identifier et de caractériser partiellement la vitellogénine de *L. forficatus*, de tester les effets du plomb et du cadmium sur la physiologie de la reproduction et plus spécifiquement sur la vitellogenèse et ensuite de voir si l'on pouvait éventuellement utiliser les variations du taux de vitellogénine hémolymphatique comme biomarqueur de pollution métallique.

Matériel et méthodes

Des adultes matures de *L. forficatus* ont été récoltés à la fin de l'été (mi-septembre) en différents sites localisés dans le département du Nord de la France. Les animaux provenant d'un secteur pollué ont été récoltés dans une pelouse métallicole située à Mortagne-du-Nord dont les taux de cadmium et de plomb étaient respectivement compris entre 6 et 76 mg/kg et entre 90 et 3900 mg/kg de poids sec. Les animaux provenant de sites non pollués ont été récoltés à Saint-Amand (Cd : 4,2 mg/kg ; Pb : 4,5 mg/kg) et à Orchies (Cd : 1,5 mg/kg ; Pb : 49 mg/kg). Des animaux de même classe de taille (poids moyen essuyé : 100 ± 10 mg) ont été utilisés pour cette étude.

De façon à être certain de la quantité de métal incorporée par l'animal, nous avons choisi de l'injecter directement dans le corps. Deux doses ont été testées pour le cadmium, 2 et 20 nmoles de $CdCl_2$ dissout dans un milieu salin adapté aux Chilopodes (NaCl, 183 mM ; KCl, 4,7 mM, $CaCl_2$, 0,19 mM à pH 6,8) ont été injectées par animal. En revanche, une seule dose de $PbCl_2$ (2 nmoles) a été injectée dans les mêmes conditions que précédemment.

Comme la récolte directe d'hémolymphe chez *L. forficatus* est délicate à cause de la taille réduite des individus, les femelles ont été découpées en plusieurs tronçons après prélèvement de l'ovaire et du tube digestif. Les fragments ont ensuite été déposés dans des microtubes de type eppendorf contenant 100 µl de tampon Tris-HCl 0,05 M contenant du NaCl 0,15 M à pH 7,4. Les microtubes ont ensuite été centrifugés pendant 20 min à 3500 tr/min. Chaque surnageant a été collecté individuellement et stocké à -20°C avant d'être analysé et a été désigné dans la suite du texte comme « hémolymphe diluée ».

La caractérisation partielle de la vitellogénine a été réalisée après séparation des constituants protéiques sur gel de polyacrylamide en gradient de porosité 5-25% en milieu non dénaturant selon la procédure décrite par SLATER (1969) en utilisant le tampon de DAVIS (1964). Les gels ont ensuite été colorés pour les protéines avec le bleu brillant de Coomassie R250, pour la partie glucidique des glycoprotéines en utilisant l'acide periodique-Schiff (PAS) et pour la partie lipidique des lipoprotéines à l'aide du noir Soudan B. Les standards de poids moléculaire utilisés étaient les suivants : thyroglobuline (Mr 669 000), ferritine (Mr 440 000), catalase (Mr 232 000), dimère d'albumine (Mr 134 000) et monomère d'albumine (Mr 67 000).

Pour l'analyse quantitative, deux méthodes ont été utilisées pour chaque échantillon, la première utilisant un même volume d'échantillon, la seconde utilisant une quantité déterminée de protéines (1 µg par échantillon). La première méthode a été réalisée à l'aide du système Phast Gel de Pharmacia, la seconde en gel de polyacrylamide comme précédemment décrit. La première méthode a été basée sur l'utilisation d'un gel de polyacrylamide en gradient de porosité 4-15% préparé industriellement sous conditions non dénaturantes. Chaque dépôt a consisté en 1 µl d'une solution préparée à partir de 20 µl d'hémolymphe diluée additionné de 1 µl d'une solution de bleu de bromophénol jouant le rôle de marqueur de migration. Les gels ont ensuite été analysés grâce à un analyseur d'image SAMBA 2005 (Alcatel-TITN, France). Avec ce système, chaque gel a été digitalisé (256 niveaux de gris). Chaque bande a été analysée et la densité optique a été exprimée en surface et hauteur du pic. Un contrôle interne pour chaque gel a permis d'ajuster les gels les uns par rapport aux autres. Les résultats ont été représentés sous forme d'histogrammes en pourcentages par rapport au contrôle non injecté (100%).

Les résultats ont été exprimés sous la forme de moyenne ± écart-type. Un test t a été utilisé afin de comparer les animaux intoxiqués par rapport aux témoins pour chaque pas de temps d'expérimentation après contamination métallique. Le niveau de significativité a été placé à 5%.

Résultats

Caractérisation partielle de la vitellogénine

L'électrophorèse en conditions non dénaturantes des protéines hémolymphatiques de femelles en phase de vitellogenèse a mis en évidence la présence de deux composés protéiques majeurs de poids moléculaires apparents 360 et 450 kDa (figure 1a). Ces deux composés se colorent également fortement avec le noir Soudan B (figure 1b) et le PAS (figure 1c), colorants spécifiques respectivement des lipides et des sucres. Ces deux composés répondent donc parfaitement à la définition des vitellogénines. L'hémolymphe d'individus mâles contient également ces deux composés mais à un taux moins important que celui des femelles (résultats non montrés).

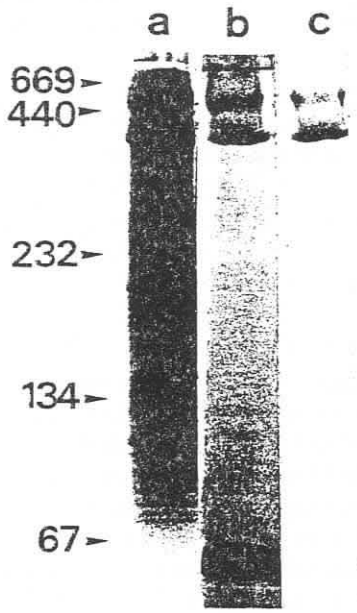


Figure 1

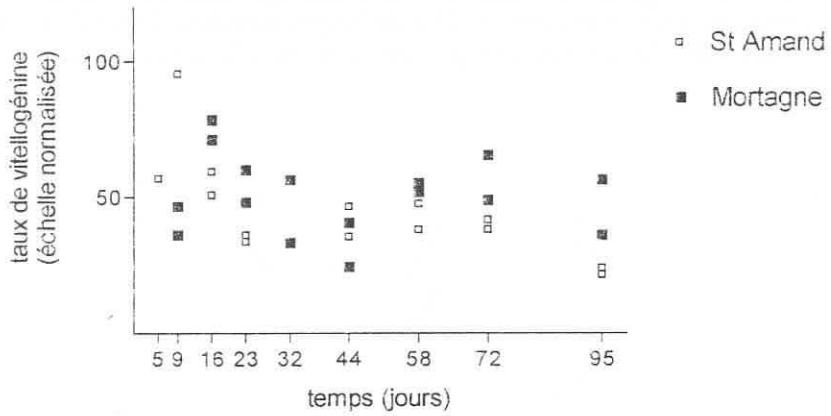
Séparation électrophorétique des protéines hémolymphatiques d'individus femelles en phase de vitellogenèse sur gradient de polyacrylamide de porosité 5-25% (a) gel coloré au Bleu brillant de Coomassie ; (b) gel coloré au noir Soudan B ; (c) gel coloré au réactif acide périodique-Schiff.

La mobilité de 6 standards est indiquée avec leurs poids moléculaires correspondants : thyroglobuline 669 000, ferritine 440 000, catalase 232 000, dimère d'albumine 134 000 et monomère d'albumine 67 000.

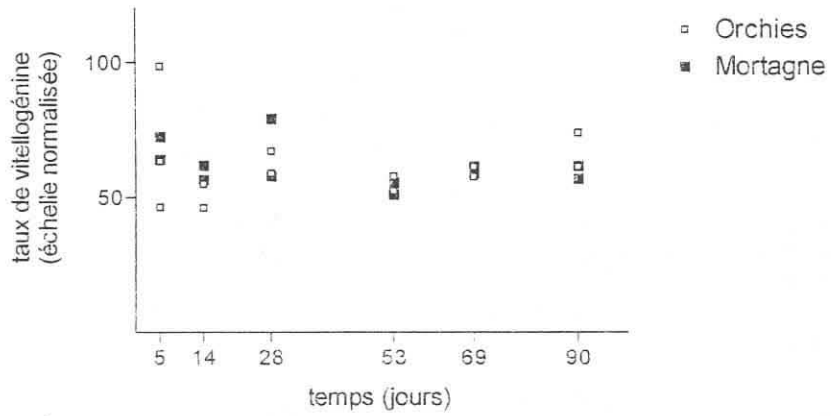
Variation des taux de vitellogénine chez des individus de *L. forficatus* provenant de différents sites de récolte

Les figures 2a et 2b traduisent l'évolution des taux de vitellogénine chez des individus provenant de deux secteurs, l'un contaminé par les métaux lourds, l'autre sain à différentes périodes après avoir été ramenés au laboratoire. Les individus provenant de la zone contaminée (Mortagne-du-Nord) possèdent pendant les 23 premiers jours des

taux de vitellogénine inférieurs à ceux des individus provenant de la zone non contaminée (Saint-Amand). Par la suite, nous observons une diminution du taux de vitellogénine chez les individus provenant du site non contaminé (figure 2a). Ce processus se traduit alors par le fait que le taux de vitellogénine dans les animaux provenant du site contaminé dépasse celui d'individus issus du site sain en fin d'expérimentation (figure 2a). En revanche, après une nouvelle collecte d'individus, les taux de vitellogénine demeurent semblables chez les individus provenant du secteur contaminé (Mortagne-du-Nord) et chez ceux récoltés au niveau du site non pollué (Orchies).



a



b

Figure 2

Évolution des taux de vitellogénine chez *Lithobius forficatus* prélevés en différents sites dans le nord de la France. Comparaison des taux de vitellogénine d'animaux provenant de sites contaminés par les métaux lourds (Mortagne-du-Nord) avec ceux d'individus récoltés sur des sites sains (a) Saint-Amand ; (b) Orchies.

Influence des métaux lourds sur les taux de vitellogénine

– Cadmium : après injection de 2 nmoles de $CdCl_2$/animal (figure 3a), aucune différence significative n'a été observée entre les contrôles et les animaux injectés. Cette quantité de cadmium n'influence donc pas le taux de vitellogénine circulante. À l'opposé, les animaux injectés avec 20 nmoles de $CdCl_2$/animal (figure 3b) présentent des taux de vitellogénine différents par rapport aux contrôles non injectés. Ainsi, le taux de vitellogénine circulante dans l'hémolymphe devient significativement moins important chez les individus intoxiqués 2 jours après l'injection. Cette différence se maintient neuf jours après l'injection. En revanche, à la fin de l'expérimentation, le taux de vitellogénine chez les animaux intoxiqués est significativement plus élevé que chez les témoins.

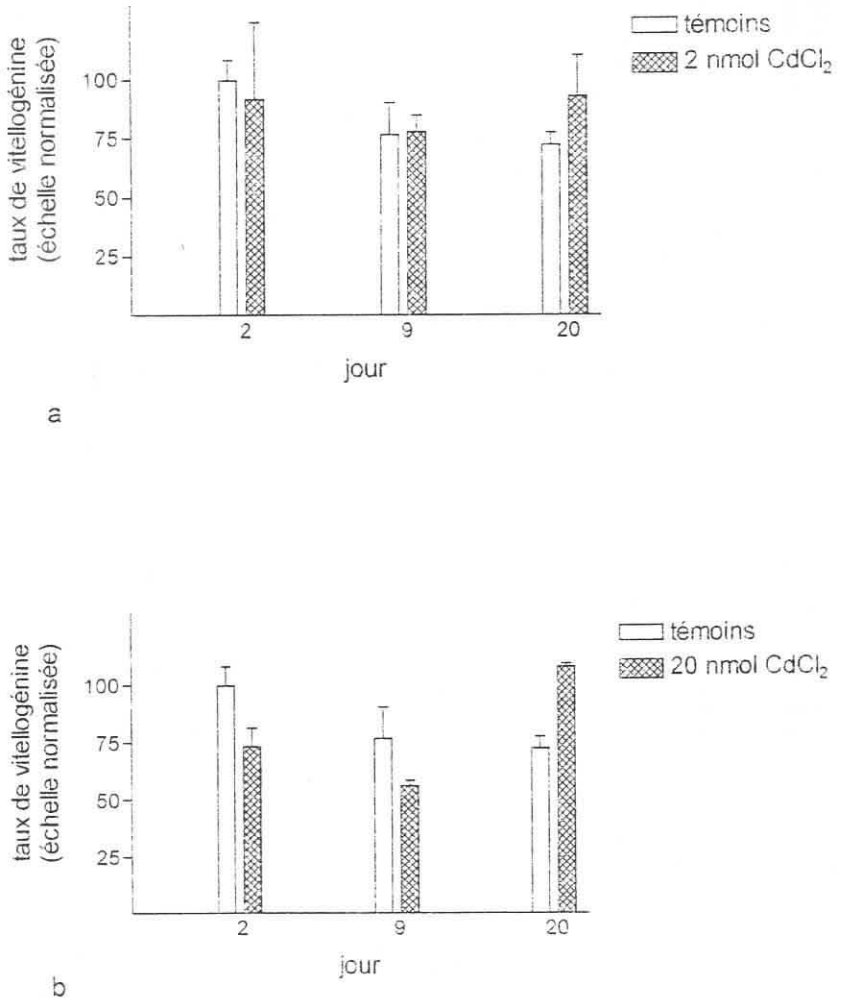


Figure 3

Effet de l'injection de 2 (a) ou 20 (b) nmoles de $CdCl_2$ par animal sur les taux de vitellogénine chez *Lithobius forficatus*. Les barres verticales représentent l'écart-type de la moyenne.

– Plomb : 2 jours après injection, nous observons une diminution significative de la vitellogénine hémolymphatique par rapport aux contrôles non intoxiqués (figure 4). Cependant, au neuvième jour après l'injection, cette différence n'est plus significative, traduisant une reprise de synthèse de vitellogénine chez les individus intoxiqués. Comme pour le cadmium, vingt jours après l'injection, les animaux intoxiqués présentent un taux de vitellogénine circulante significativement plus élevé que chez les témoins.

Les analyses des gels obtenus après séparation des constituants protéiques par électrophorèse en gel de polyacrylamide en gradient de porosité 5-25% et dépôt de 1 µg de protéines par puits ne mettent pas en évidence de différences significatives entre les témoins et les animaux intoxiqués.

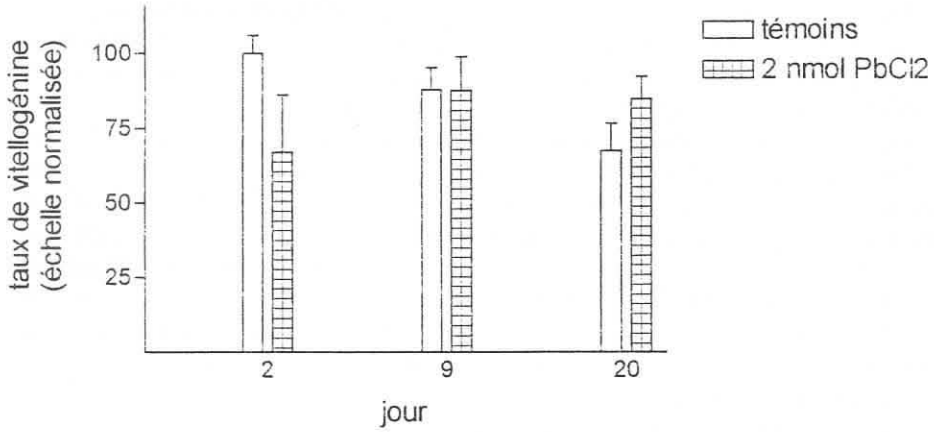


Figure 4

Effet de l'injection de 2 nmoles de $PbCl_2$ par animal sur les taux de vitellogénine chez *Lithobius forficatus*. Les barres verticales représentent l'écart-type de la moyenne.

Discussion

Concernant la structure de la vitellogénine de *L. forficatus*, nous avons mis en évidence la présence de deux molécules définies comme des vitellogénines (360 et 450 kDa) à la fois chez les individus mâles et les individus femelles. D'autre part, l'un d'entre nous (BRITEL, non publié) a montré, après incorporation d'un précurseur radioactif, que ces molécules sont synthétisées par le corps gras, démontrant ainsi leur véritable nature vitellogénique. Chez les Chilopodes, deux molécules de vitellogénine ont été également retrouvées chez *Scolopendra cingulata* (380 et 450 kDa, FABRE *et al.*, 1992), *Cryptops hortensis* (320 et 380 kDa), *Haplophilus subterraneus* (330 et 390 kDa), *Geophilus carpophagus* (380 et 450 kDa), alors qu'une seule molécule de vitellogénine a été retrouvée chez *Necrophloephagus longicornis* (380 kDa), *Scutigera coeloptrata* (360 kDa) et *Lithobius variegatus* (360 kDa) (SCAPS *et al.*, 1996). Chez toutes ces espèces, on retrouve également les mêmes molécules de vitellogénine chez les individus mâles mais à un taux nettement moins élevé.

Chez les Chilopodes, la démonstration de l'incorporation potentielle de ces vitellogénines dans les ovocytes en cours de croissance n'a pour l'instant pas encore été établie, ni pour *Scolopendra cingulata* (FABRE *et al.*, 1992), ni pour *L. forficatus*. Chez *L. forficatus*, HERBAUT (1974) a montré que généralement des ovaires implantés chez le mâle ne dégénèrent pas mais que le processus de vitellogenèse ne s'accomplit pas. Dans un cas naturel d'intersexualité décrit chez cette espèce, des ovocytes en phase de vitellogenèse n'ont pas été observés (DESCAMPS et HERBAUT, 1971). Aussi, selon FABRE *et al.* (1992), la présence dans l'hémolymphe des mêmes bandes protéiques chez des individus mâles et femelles ne signifie pas que les mâles possèdent de vraies vitellogénines.

L'évolution des taux de vitellogénine chez *L. forficatus* après le prélèvement des individus *in situ* et leur suivi au laboratoire ne met pas en évidence de variation au cours du temps chez les individus récoltés en milieu pollué. En revanche, lors d'une première récolte en milieu non pollué (Saint-Amand), on observe une diminution du taux de vitellogénine circulante ; cependant, cette diminution n'a pas été retrouvée lors d'une deuxième collecte d'individus en milieu sain (Orchies). Ainsi, l'incorporation de vitellogénine dans les ovocytes en cours de croissance serait moins importante chez les animaux exposés aux métaux lourds ou bien la différence observée serait d'ordre microclimatique. Cette dernière hypothèse semble à privilégier ; en effet, il a été montré précédemment que le cycle vitellogénétique est en grande partie corrélé avec les variations climatiques (HERBAUT, 1975). Dans ces conditions, la différence observée entre l'évolution des taux de vitellogénine hémolymphatique chez des animaux provenant de sites contaminés ou non par les métaux lourds pourrait s'expliquer par des conditions microclimatiques différentes. De plus, il a été montré dans des études précédentes (HOPKIN *et al.*, 1985 ; READ & MARTIN, 1990) que les Chilopodes représentent l'un des groupes d'invertébrés du sol capables de survivre dans les sols contaminés par les métaux lourds. Récemment, un processus de décontamination pour le cadmium et le plomb a été démontré expérimentalement chez *L. forficatus* par DESCAMPS *et al.* (1996). Le taux d'élimination pour le cadmium et le plomb est d'environ 20 mg/kg poids sec pendant dix semaines. Ce processus de décontamination pourrait expliquer l'absence de différence entre les taux de vitellogénine d'animaux prélevés en mililieu contaminé ou sain, les animaux intoxiqués ayant alors un cycle physiologique normal. En revanche, lorsque le cadmium ou le plomb est injecté directement dans les animaux, nous observons en première phase une diminution significative des taux de vitellogénine en comparaison avec des contrôles non pollués puis secondairement un processus de compensation. En conséquence, l'étude de l'évolution de la production de vitellogénine dans des populations naturelles de Chilopodes ne s'avère pas utilisable en tant que biomarqueur de pollution par les métaux lourds.

Les résultats concernant l'importance respective des protéines hémolymphatiques mettent en évidence que les effets observés et discutés précédemment ne sont pas spécifiques de la vitellogenèse mais concernent plutôt la physiologie globale de l'animal.

Écophysiologie d'Invertébrés du Sol, Laboratoire de Biologie Animale,
Université de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex (France).

Remerciements

Le présent travail a reçu le soutien financier de l'« Espace Naturel Régional du Nord-Pas-de-Calais et de la Fondation de France » (étude de la pelouse métallicole de Mortagne-du-Nord) et celui de la région Nord-Pas-de-Calais (Programme de Recherches Concertées : « Évaluation d'un secteur pollué par les métaux en vue de sa requalification »).

RÉFÉRENCES

DALLINGER, R. & RAINBOW, P.S. (1993).- Ecotoxicology of metals in terrestrial invertebrates, Lewis Publisher, Chelsea, USA.

DAVIS, B.J. (1964).- Disc electrophoresis II: Method and applications to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.

DESCAMPS, M. & HERBAUT, C. (1971).- Sur un cas d'intersexualité chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode Chilopode). *C.R. Acad. Sci. Paris (D)*, **272**, 1648-1651.

DESCAMPS, M., FABRE, M.C., GRELLE, C. & GERARD, S. (1996).- Cadmium and lead kinetics during experimental contamination and decontamination of the centipede *Lithobius forficatus* L. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 1996, **31**, 350-353.

FABRE, M.C., DESCAMPS, M. & BAERT, L. (1992).- Identification and partial characterization of vitellin and vitellogenin from *Scolopendra cingulata* Latreille. *Ber. nat. med. Verein. Innsbruck*, suppl. **10**, 117-121.

HERBAUT, C. (1974).- Contribution à l'étude du cycle ovogénétique et de son déterminisme chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode Chilopode). Thèse Doct. Sci., Lille, 125 p.

HERBAUT, C. (1975).- Influence des facteurs externes sur le cycle ovogénétique chez *Lithobius forficatus* (Myriapode Chilopode). *Arch. Zool. exp. gen.*, **116**, 293-302.

HOPKIN, S.P. (1989).- Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier Applied Science, London and New York.

HOPKIN, S.P. & MARTIN, M.H. (1984).- The assimilation of zinc, cadmium, lead and copper by the centipede *Lithobius variegatus* (Chilopoda). *J. Appl. Ecol.*, **21**, 535-546.

HOPKIN, S.P., WATSON, K., MARTIN, M.H. & MOULD, M.L. (1985).- The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda: Diplopoda). *Bijdr. Dierk.*, **55**, 88-94.

READ, H.J. & MARTIN, M.H. (1990).- A study of myriapod communities in woodlands contamined with heavy metals. *In: Proceeding of the 7th International Congress of Myriapodology*, pp. 289-298, Minelli, A. ed., Leiden.

SCAPS, P., DESCAMPS, M. & FABRE, M.C. (1996).- Étude comparative des vitellogénines chez les Myriapodes Chilopodes. *100ème Congrès Annuel de la Société zoologique de France, Paris, 27-29 juin 1996.*

SLATER, G.G. (1969).- Stable pattern formation and determination of molecular size by pore-limit electrophoresis. *Anal. Chem.*, **41**, 1039-1041.

SPURGEON, D.J., HOPKIN, S.P. & JONES, D.T. (1994).- Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.*, **84**, 123-130.

VAN STRAALEN, N.M. & VAN WENSEM, J. (1986).- Heavy metal content of forest litter arthropods as related to body-size and trophic level. *Environ. Pollut.*, **42A**, 209-221.

(reçu le 26/11/96 ; accepté le 11/04/97)